Über Azofarbstoffe des Bilirubins.

I. Vorläufige Mitteilung.

Von

Hans Fischer und Hermann Barrenscheen.

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut zu Wien.)
(Der Redaktion zugegangen am 11. April 1921.)

In Verfolgung seiner im Harn entdeckten Diazoreaktion beschrieb Ehrlich¹⁾ 1883 eine Farbenreaktion, welche das Bilirubin in einer Lösung von Chloroform unter Zusatz von Alkohol mit Diazobenzolsulfosäure gibt und die für das Bilirubin allein charakteristisch ist, während andere Abkömmlinge des Gallenfarbstoffes — Ehrlich nennt Biliverdin, Bilifuscin, Biliprasin und Urobilin — die Reaktion nicht geben. Eine nähere chemische Charakterisierung des bei dieser Reaktion entstehenden Farbstoffes versuchte Fr. Pröscher²⁾ 1900 in einer aus dem Ehrlich'schen Institut erschienenen Arbeit. Pröscher kuppelte Bilirubin in einer Chloroformlösung unter Zusatz von Alkohol bei stark salzsaurer Reaktion mit Diazoacetophenon und gelangte durch Abtrennen des Chloroforms, das den gesamten Farbstoff mitnimmt, durch Wasser und Abdunsten des Chloroforms zu einem kristallinischen Produkt, das nach mehrmaligem Umkristallisieren aus Chloroform „nahezu analysenrein“ sein sollte. Die von Pröscher gefundenen Analysenwerte — C = 66,17 %, H = 5,77 %, N = 12,44 % — wurden von ihm auf das Monazoderivat des Bilirubins gedeutet unter der Annahme einer Formel mit 16 Kohlenstoffen für das Bilirubin. Die Pröscher'schen Angaben erfuhren eine

¹⁾ P. Ehrlich, Zentralbl. f. klin. Med. 1883, Bd. 45, S. 721.

²⁾ Fr. Proescher, Diese Zeitschr. Bd. 29, S. 411 (1900).

Erweiterung und Korrektur durch die eingehende Arbeit von Orndorf und Teeple¹⁾, welche feststellten, daß bei der Diazoreaktion des Bilirubins zwei Farbstoffe entstehen, ein Monazo- und Disazofarbstoff, welche sich durch fraktioniertes Umkristallisieren trennen ließen. Bei ihren Untersuchungen gingen sie von dem Kupplungsprodukt des Bilirubins mit diazotiertem Tribromanilin aus, welches wegen der großen Differenzen im Halogengehalt der einzelnen Farbstoffe auch für die Bestimmung der Molekulargröße des Bilirubins besonders geeignet erschien. Auf Grund der Halogenbestimmungen berechneten sie für das Bilirubin eine Formel von 32 Kohlenstoffen. Die experimentelle und rechnerische Nachprüfung der Pröscherschen Resultate ergaben ihnen, daß Pröscher die Disazoverbindung in Händen hatte, während ihm das in geringeren Mengen entstehende Monazoderivat entgangen war.

Von klinischer Seite wurde die Ehrlichsche Reaktion von A. A. Hijmans van den Bergh²⁾ zum Nachweis des Gallenfarbstoffes im Blute aufgegriffen und zu einer quantitativen kolorimetrischen Methode ausgebaut. Ohne uns auf die klinische Bedeutung der van den Berghschen Resultate einlassen zu wollen, möchten wir an dieser Stelle nur erwähnen, daß die von ihm angegebenen Werte unter allen Umständen zu hoch sind, wie wir uns durch gelegentliche Untersuchungen überzeugen konnten. In der ersten Fassung seiner Methode benützt van den Bergh als Testlösung eine gekuppelte Bilirubinlösung, welche durch Auflösen des Abdampfrückstandes einer chloroformigen Bilirubinlösung in 0,6% Bikarbonat haltigem 70% igem Alkohol hergestellt wurde. Dazu ist zu bemerken, daß reines Bilirubin in Alkohol praktisch unlöslich ist und daran auch der Zusatz von Bikarbonat nichts ändert. Es ist uns auch nie gelungen, außer einer partiellen Suspension eine vollkommene Lösung des Chloroformrückstandes in dem Alkohol zu erzielen, gleichgültig, ob das Chloroform auf dem Wasserbad verjagt oder freiwillig abdunsten gelassen wurde. Vergleiche mit einer Testlösung, welche durch Kupplung der Chloroformlösung in der entsprechenden Menge Alkohol hergestellt wurde, und mit einer nach der van den Berghschen Vorschrift erhaltenen alkoholischen Lösung ergaben Differenzen bis zu 66% zu ungunsten der van

¹⁾ W. R. Orndorf und J. E. Teeple, Salkowski-Festschrift. Berlin, Hirschwald 1904; ferner Americ. Chem. Journ. Bd. 33, Nr. 3, S. 215 (1905).

²⁾ A. A. Hijmans van den Bergh, Der Gallenfarbstoff im Blut, Monographie, Leipzig 1918.

den Berghschen Methode. Dazu kommt, daß auch bei Verwendung der Chloroformlösung durchaus nicht das ganze Bilirubin gekuppelt wird, wie man sich durch Abscheiden des Chloroforms durch Wasser überzeugen kann. Auch ist es durchaus nicht gleichgültig, wann man die Ablesung macht, vielmehr wird das Maximum der Farbtintensität erst nach 10 Minuten erreicht, um sich dann durch mehrere Stunden unverändert zu halten. Der Einwand, welcher gegen die ursprüngliche Methode gemacht wurde, gilt in gleicher Weise für die ätherische Ferrirhodanidlösung, welche van den Bergh jetzt als Testlösung angibt. Handelt es sich jedoch nur um Vergleichsuntersuchungen für klinische Zwecke, so soll die Brauchbarkeit der Methode nicht geleugnet werden, nur gibt sie keinen Maßstab für die absolute Menge des Bilirubins. Hier möchten wir noch erwähnen, daß uns eine Lösung von 5 mg Bilirubin in 100 cm³ Chloroform, die wir Anfang Mai vorigen Jahres herstellten, mit einer Ende August bereiteten Lösung vollkommen übereinstimmte und beide Lösungen auch jetzt — Ende März — im Dunkel und gut verschlossen aufbewahrt ihren „Titer“ nicht geändert haben.

Das Studium dieser Farbstoffe bietet ein besonderes Interesse deshalb, weil in den bisherigen Untersuchungen nicht der Nachweis erbracht ist, ob es sich wirklich um Azofarbstoffe oder etwa nicht um Diazoaminverbindungen handelt. Für die Konstitution des Bilirubins ist nun die Entscheidung über diesen Punkt von großer Wichtigkeit, weil im Falle des Vorliegens von Azofarbstoffen der Nachweis erbracht ist, daß im Bilirubin freie Methingruppen vorhanden sind, während beim Vorliegen von Diazoaminverbindungen keinerlei Entscheidung über diesen Punkt zu fällen ist. Nach den Untersuchungen von K. H. Meyer [Ber. 52, S. 1468] wäre allerdings auch ein Eingreifen des Azorestes in der ungesättigten Seitenkette möglich. Eine Entscheidung über diesen Punkt wird sehr leicht zu bringen sein, indem Mesobilirubin sich dann bei der Kupplung wesentlich anders verhalten muß, eine Untersuchung, die demnächst ausgeführt werden soll, ebenso die Kupplungsbedingungen des Mesobilirubinogens. Vorläufig wurde neuerdings wieder das Studium der Azofarbstoffe des Bilirubins aufgenommen. Es gelang sehr bald, die Farbstoffe mit Diazobenzolsulfosäure als Baryumsalz kristallisiert abzuscheiden. Da jedoch die Reinigung und Trennung auf Schwierigkeiten stieß, so wurden die Farbstoffe mit Diazobenzolchlorid dargestellt und untersucht.

In Bestätigung der Angaben der amerikanischen Autoren wurde auch hier das Auftreten von zwei Farbstoffen nebeneinander beobachtet. Näheres im experimentellen Teil. Nach den Analysen unterliegt es keinem Zweifel, daß nebeneinander ein Monazo- und Disazofarbstoff entsteht, jedoch ist es noch nicht gelungen, den Monazofarbstoff von dem rein dargestellten Disazoprodukt vollkommen zu trennen. Weitere Diazverbindungen, insbesondere solche mit noch stärkerem Kupplungsvermögen wie Dichlordiazobenzolchlorid und andere, sollen auf ihr Verhalten gegen Bilirubin noch untersucht werden.

Von besonderem Interesse scheint es uns, daß das Bilirubin durch den Eintritt eines bzw. zweier Azoreste die Fähigkeit zur Bildung von komplexen Salzen erlangt hat. Diese Beobachtung erscheint uns deshalb interessant, weil damit ein weiterer Hinweis auf verwandtschaftliche Beziehungen zwischen Blut- und Gallenfarbstoff gegeben ist. Bilirubin und seine Derivate unterscheiden sich ja prinzipiell vom Blutfarbstoff und seinen Derivaten dadurch, daß sie nicht imstande sind, mit Metallen Komplexsalze zu bilden. Diese Eigenschaft scheint mit der Basizität bzw. Azidität des zugrunde liegenden Pyrrolgerüsts zusammenzuhängen, insofern als von Blutfarbstoffen auch dem stärker sauren Hämatoporphyrin im Gegensatz zum Mesoporphyrin die Fähigkeit zur Komplexsalzbildung abgeht. Ob Hämatoporphyrin ester imstande sind, Komplexsalze zu bilden, wäre noch zu untersuchen. Ähnlich liegen offenbar die Verhältnisse beim Bilirubin. Durch den Eintritt des Azorestes sind anscheinend die Verhältnisse des Bilirubins so verändert, daß nunmehr der Boden zur Komplexsalzbildung vorbereitet ist.

Die Reduktion der Azofarbstoffe gelingt leicht mit Hilfe von Natriumhydrosulfit ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$). Die Untersuchung der Reaktionsprodukte konnte jedoch durch die Übersiedlung des einen von uns nach München nicht mehr abgeschlossen werden. Dies ist auch der Grund, weshalb die Veröffentlichung dieser noch nicht abgeschlossenen Arbeit schon jetzt erfolgt.

Experimenteller Teil.

1. Versuche mit Diazobenzolsulfosäure.

In dieser Versuchsreihe wurde je 0,1 g reines Bilirubin mit 0,2 g frisch dargestellter Diazobenzolsulfosäure gekuppelt. Das Bilirubin wurde in 100 cm³ Chloroform unter Erwärmen auf dem Wasserbad gelöst, vom etwa Ungelösten filtriert und nach Zusatz von 250 cm³ Alkohol mit der in der entsprechenden Menge destillierten Wassers gelösten Diazobenzolsulfosäure gekuppelt. Ein Teil dieser Versuche wurde bei stark saurer Reaktion — Zusatz von 10 cm³ 25 %iger Salzsäure bzw. 30 cm³ 10 %igem Salzsäurealkohol — durchgeführt, ein Teil bei neutraler Reaktion. Der Zusatz der Diazobenzolsulfosäure erfolgte portionenweise unter ständigem Schütteln, nach Beendigung des Zusatzes wurde noch längere Zeit, bis zu einer Stunde, kräftig geschüttelt, um die Reaktion möglichst vollständig zu gestalten. Zur Abscheidung des Farbstoffes wurde die alkoholische Lösung mit reichlich Wasser versetzt. Dabei gelang es jedoch nicht, den ganzen Farbstoff, der in saurer Lösung blau-violett, in neutraler purpurrot ist, mit dem Chloroform zur Abscheidung zu bringen, vielmehr blieb ein großer Teil des Farbstoffes in der wäßrigen Lösung zurück, aus der er erst durch reichlich Chloroform oder Amylalkohol herausgeholt werden konnte. Zur Entfernung nicht verbrauchter Diazobenzolsulfosäure wurde das Chloroform mehrmals mit Wasser geschüttelt, wobei bei den Ansätzen in saurer Lösung die anfangs blauviolette Farbe in Purpurrot umschlägt. Aus dem Chloroform läßt sich der Farbstoff mit Leichtigkeit durch verdünntes Bikarbonat — 0,5 g auf 20 cm³ Wasser — herausholen. Dabei zeigt sich, daß, namentlich bei der Kupplung in stark saurer Reaktion, ein Teil des Bilirubins ungekuppelt in dem Chloroform zurückbleibt. Aus der Bikarbonatlösung fällt der Farbstoff nach Zusatz von einigen Tropfen Salzsäure in feinsten Flocken aus, noch besser gelingt die Ausfällung nach vorsichtiger Neutralisation durch Kochsalz. Ungekuppeltes Bilirubin ließ sich in dieser Fällung nicht nachweisen. In späteren Versuchen wurde die Abscheidung des Chloroforms

durch Wasser vermieden und Chloroform und Alkohol durch Destillation im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur entfernt. Die Ausfällung des Farbstoffes war analog wie in den ersten Versuchen. Der gefällte Farbstoff wurde durch gehärtete Filter abgesaugt, kurz mit Wasser nachgewaschen — dabei geht reichlich Farbstoff in Lösung — und im Vakuum getrocknet. Der freie Farbstoff zeigt grün-rote Fluoreszenz, ist in Wasser leicht löslich, in verdünnter Essigsäure unlöslich. In Alkohol, Amylalkohol mit roter Farbe löslich, aus Alkohol durch Essigester in feinen amorphen Flocken fällbar. In Pyridin sehr leicht mit roter Farbe löslich, durch Petroläther daraus in amorphen Flocken fällbar. Spektroskopisch zeigt er eine gleichmäßige Absorption vom Grün angefangen. Versetzt man die wäßrige Lösung mit einigen Tropfen konzentrierter Salzsäure, so schlägt die Farbe in Blauviolett um. Weiterer Zusatz von Säure fällt den Farbstoff in amorphen, schmierigen Flocken. Es gelang nicht, bei Versuchen mit kleinen Mengen den Farbstoff aus einem der Lösungsmittel einwandfrei kristallisiert zu erhalten. Dagegen gelingt es leicht, aus der wäßrigen Lösung nach Zusatz von einem Tropfen Ammoniak und Chlorbaryum das Baryumsalz des Farbstoffes in schönen mikroskopischen Nadeln zur Abscheidung zu bringen. Die Analyse eines so erhaltenen Produktes hatte folgende Ergebnisse:

1,355 mg Substanz geben 0,113 cm N, 20°, 750 mm Hg, entspr. 9,59% N,
4,625 mg Substanz geben 2,106 mg Ba SO₄, entspr. 26,79% Ba.

Das Analysenresultat ist am ehesten in Einklang zu bringen mit dem Baryumsalz einer Disazoverbindung mit einem Baryumsalz des Bilirubins, jedoch beträgt auch hier die Differenz im Baryum über 3%. Versuche, durch Fraktionieren eine Trennung und Reinigung der Farbstoffe zu erzielen, stießen jedoch auf Schwierigkeiten, so daß wir die Untersuchungen hier abbrachen, zumal das Diazobenzolchlorid sich als viel geeigneter erwies.

In einer Anzahl von Versuchen wurde auch versucht, um das Chloroform zu umgehen, eine Kupplung mit einer Lösung von Bilirubin in 1/10-Normalnatronlauge und in Ammoniak [wäßrige bzw. alkoholische Lösung] zu erzielen. Die Kupplung der Bilirubinlösung in Natronlauge — 0,1 g

Bilirubin in 20 cm³ 1/10-Normallauge — gelingt bei Zusatz von Alkohol nach längerem Schütteln, der Farbstoff läßt sich durch Ansäuern mit Salzsäure und Versetzen mit Kochsalz leicht ausfällen, ist jedoch noch reichlich mit ungekuppeltem Bilirubin verunreinigt. Ebenso gelingt die Kupplung einer alkoholisch-ammoniakalischen Bilirubinlösung unter Zusatz von Salzsäurealkohol glatt. 0,1 g Bilirubin wurden in 20 cm³ 95% igem Alkohol suspendiert und in diese Suspension unter Kühlung trockenes Ammoniak eingeleitet. Anfangs erfolgt scheinbar keine Spur von Lösung, nach längerem Einleiten tritt plötzlich Lösung ein, die auch bei Zusatz von überschüssigem Alkohol bestehen bleibt. Die ammoniakalische Bilirubinlösung wurde allmählich einer mit 60 cm³ 10% igem Salzsäurealkohol versetzten Lösung von Diazobenzolsulfosäure zugesetzt. Es tritt momentane Kupplung mit tief blaugrüner Farbe auf, beim Einengen der Lösung im Vakuum bei Zimmertemperatur fällt der Farbstoff nach Entfernung von ungefähr der Hälfte des Lösungsmittels in feinen Flocken aus und kann durch Kochsalz fast quantitativ abgeschieden werden. Ebenso gelingt die Kupplung der alkoholisch-ammoniakalischen Bilirubinlösung ohne Säurezusatz, doch entgeht hier wegen der gleichzeitigen Zersetzung der Diazobenzolsulfosäure ein großer Teil des Bilirubins der Kupplung. Ein Versuch, das Bilirubin in wäßriger ammoniakalischer Lösung zu kuppeln — zur Lösung des Bilirubins ist viel Ammoniak erforderlich — ergab unter reichlicher Stickstoffentwicklung einen Farbumschlag in ein tiefes Braunrot, das in stärkerer Verdünnung an eine alkalische Bilirubinlösung erinnerte. Auf Zusatz von Säure fällt jedoch kein Bilirubin aus, auch durch Chloroform läßt sich unverändertes Bilirubin nicht extrahieren. Der für die Azofarbstoffe charakteristische Farbumschlag auf Säurezusatz bleibt aus. Eine weitere Untersuchung des Reaktionsproduktes, das sich nach Eindampfen der Lösung im Vakuum und Aufnahme in Alkohol durch Baryumchlorid in braunen amorphen Flocken fällen ließ, ist nicht erfolgt.

2. Versuche mit Diazobenzolchlorid.

In dieser Reihe wurden 0,1 g, später 0,5 g Bilirubin nach Lösen in Chloroform und Zusatz der entsprechenden Menge Alkohol mit der zwei- bis achtfach molaren Menge einer frisch in der üblichen Weise hergestellten Lösung von Diazobenzolchlorid gekuppelt. Der Zusatz der Diazolösung erfolgte tropfenweise unter Kühlung, welche durch Eintragen von Eisstückchen in die Flüssigkeit unterstützt wurde. Die Kupplung erfolgt momentan unter Umschlag der Farbe in ein tiefes Purpurrot. Das Chloroform, welches den ganzen Farbstoff mitnimmt, wurde durch Wasser abgeschieden und wiederholt gewaschen. Nur in den ersten Waschwässern ließ sich

unverändertes Diazobenzolchlorid mit R-Salz nachweisen. Die anfangs farblosen Ausschüttlungen nehmen, offenbar durch Entziehung des Alkohols aus dem Chloroform, eine mehr oder weniger intensive Gelbfärbung an, die auf ungekuppeltes Bilirubin zurückzuführen ist, gleichzeitig fällt ein Teil der Farbstoffe in braun-roten, amorphen Flocken aus. Anfangs wurde versucht, die Farbstoffe durch fraktioniertes Kristallisieren aus Äther und Chloroform zu isolieren, da jedoch so nur eine unvollkommene Trennung gelang und stets ungekuppeltes Bilirubin nachweisbar war, wurde folgender Weg mit Erfolg beschritten. Das wiederholt gewaschene Chloroform wurde im Vakuum bei gewöhnlicher Temperatur abdestilliert, der kristallinische Rückstand in 15–20 cm³ 95% igem Alkohol — bei einem Ansatz von 0,5 g Bilirubin — kochend gelöst und die alkoholische Lösung möglichst warm filtriert. Dabei bleibt das ungekuppelte Bilirubin zum Teil an der Wand des Kolbens, zum Teil auf dem Filter zurück. Beim Erkalten, noch rascher beim Einstellen in Eis, kristallisiert bereits reichlich Farbstoff aus. Nach einigen Stunden Stehen in Eis wurde von der ersten Kristallisation abgesaugt. Die Ausbeute betrug bei einem Ansatz von 0,5 g Bilirubin 0,25 bis 0,34 g. Aus der Mutterlauge kristallisiert beim Stehen über Nacht ein weiterer beträchtlicher Teil des Farbstoffgemisches aus. Eine Analyse des so erhaltenen Rohproduktes ergab:

2,705 mg Substanz geben 0,307 cm³ N, 19°, 760 mm Hg = 13,27% N, ein Wert, der auf das Vorhandensein von zwei Farbstoffen, eines Monazo- und Disazoproduktes hinwies. Zur Trennung und Isolierung der beiden Farbstoffe wurde die erste Kristallisation fraktioniert mit je 5 cm³ Alkohol unter Erwärmen ausgezogen. Dabei zeigte sich, daß sich die Farbstoffe durch ihre verschiedene Löslichkeit in Alkohol — das Monazoderivat ist leicht löslich, das Disazo schwer und erst nach längerem Kochen — trennen lassen. Nach wiederholtem Fraktionieren gelang es, den Disazofarbstoff rein zu erhalten, der Monazofarbstoff gab jedoch keine vollkommen stimmenden Werte.

Monazoprodukt: a) 6,525 mg Substanz geben 0,723 cm³ N, 21°, 761 mm Hg.

b) 7,42 mg Substanz geben 0,814 cm³ N, 21°, 755 mm Hg.

Berechnet für $C_{88}H_{86}N_4O_6 [N_2C_6H_5] 12,21\% N$.

Gefunden: Farbstoff a) 12,8%, % N, Farbstoff b) 12,65% N.

Disazofarbstoff: a) 3,74 mg geben 0,441 cm³ N, 19°, 758 mm Hg.

b) 3,35 mg geben 0,418 cm³ N, 22°, 757 mm Hg.

Berechnet für $C_{88}H_{84}N_4O_6 [C_6H_5N_2]_2 14,14\% N$.

Gefunden: Farbstoff a) 13,97% N, Farbstoff b) 14,38% N.

Aus Chloroform kristallisiert stellt das Farbstoffgemisch eine mikroskopisch anscheinend einheitliche Masse von schlanken geraden Prismen dar, welche bei langsamem Eindunsten des Lösungsmittels in prachtvollen makroskopischen Büscheln erscheinen. Durch Petroläther werden die Farbstoffe aus Chloroform nach längerem Stehen kristallisiert gefällt. Die Kristallisation aus Äther ist der aus Chloroform gleich. Aus Alkohol kristallisiert der Monazofarbstoff in kleinen braunroten Prismen, der Disazofarbstoff monoklin, ist makroskopisch tief schwarzrot mit deutlichem, an Fuchsin erinnernden Metallglanz. Unter dem Mikroskop erscheinen die Kristalle im durchfallenden Licht tief dunkelrot, im auffallenden Licht fast schwarz. Ein Schmelzen wurde bei Temperaturen bis 280° nicht beobachtet. In Wasser sind die Farbstoffe unlöslich, aus Alkohol werden sie durch reichlich Wasser in amorphen violetten Flocken gefällt, die sich durch Chloroform nur schwer aufnehmen lassen. In verdünnten Säuren sind die Farbstoffe unlöslich, mit konzentrierter Salzsäure oder Schwefelsäure geben sie blauviolette Lösungen. In Eisessig gehen sie leicht mit roter Farbe in Lösung. In Pyridin lösen sie sich mit braunroter Farbe, durch Eisessig sind sie daraus nicht fällbar. In Lauge von stärkerer Konzentration sind sie unlöslich, in verdünnter Lauge spielend löslich mit rotvioletter Farbe. In Ammoniak sehr leicht löslich, der Monazofarbstoff in braunroter Farbe, das Disazoprodukt in schönem Violett. Spektroskopisch zeigt die neutrale Lösung in Alkohol nur eine vom Grün beginnende gleichmäßige Verdunkelung ohne ausgesprochenen Absorptionsstreifen.

3. Darstellung der Kupferverbindungen der Farbstoffe mit Diazobenzolchlorid.

0,2 g der ersten Farbstoffkristallisation aus Alkohol werden in wenigen cm³ Eisessig unter Erwärmen gelöst und

mit einer kochend bereiteten Lösung von 0,1 g reinem Kupferazetat in Eisessig versetzt. Es tritt augenblicklicher Farbumschlag von Rot in Violett ein, das bei kurzem Kochen in ein ausgesprochenes Blauviolett übergeht. Durch reichlich Wasser werden die Farbstoffsalze in feinsten Flocken gefällt, durch Zusatz einiger Tropfen Sodalösung wird die Fällung vollständig und läßt sich durch ein gehärtetes Filter leicht absaugen. Der Niederschlag wird auf dem Filter bis zur Freiheit von Essigsäure gewaschen und stellt nach dem Trocknen ein blauviolett Pulver dar. Extrahiert man den Niederschlag mit Chloroform, so geht zunächst eine rotviolette Fraktion in Lösung. Unterbricht man hier die Extraktion und behandelt weiter mit frischem Chloroform, so erhält man eine blauviolette Fraktion. Eine neuerliche Extraktion mit Chloroform ergibt eine rein blaue Lösung, welche spektroskopisch ein breites, unscharf begrenztes Absorptionsband im Gelb und Grün zeigt. Die violette Fraktion zeigt eine gleichmäßige Verdunkelung des Spektrums vom Gelb angefangen. Nach dem Einengen kristallisiert das Farbstoffsalz der ersten rotvioletten Fraktion aus Chloroform in kleinen drusigen Wärrchen, die aus länglichen Prismen bestehen. Die Kristallisation der blauen Fraktion zeigt mehr oder weniger schön ausgebildete Rhomboeder. Neben diesen in Chloroform löslichen Anteilen wurde noch eine in Chloroform unlösliche beträchtliche Menge eines Farbstoffes erhalten, der sich frisch in Pyridin mit einer dunkelolivgrünen Farbe löste. Nach dem Trocknen und Stehen von einigen Tagen verschwindet diese Pyridinlösbarkeit vollkommen. Aus Pyridin fällt diese Fraktion mit Äther oder Petroläther in dunkelgrünen Flocken, ein geringer Teil bleibt mit blaugrüner Farbe in Lösung. Auf Zusatz von Eisessig schlägt die Farbe der Pyridinlösung in ein schmutziges Braunrot um, durch Wasser und einige Tropfen Sodalösung wird eine unvollkommene Fällung bewirkt. Eine Kristallisation dieses Anteils konnte bis jetzt nicht erhalten werden. Bei den kristallisierten Produkten handelt es sich offenbar um zwei Farbstoffe, doch ist es nach den zahlreichen Analysen zweifelhaft, ob eine vollkommene Trennung erzielt worden ist. Bei der Total-

analyse des in Chloroform schwer löslichen blauen Farbstoffes wurden Zahlen erhalten, die nicht schlecht auf eine Formel

stimmten. Jedoch bedarf dieses Resultat noch der Nachprüfung.

4. Reduktionsversuche mit den Farbstoffen.

Durch Zinkstaub wird eine fast augenblickliche Reduktion der Farbstoffe in alkalischer Lösung erreicht, das Filtrat ist nur mehr schwach gelblich gefärbt, gibt keine Reaktion auf Bilirubin. Die Hauptmenge des Reaktionsproduktes wird jedoch von dem Zinkstaub zurückgehalten. Versuche mit Natriumamalgam oder Zinnchlorür ergaben nur eine unvollständige Reduktion. Dagegen gelingt es leicht, durch Natriumhydrosulfit, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$, eine vollständige Reduktion zu erzielen. 0,2 g des aus Alkohol kristallisierten Farbstoffgemisches wurden in 5 cm³ 1/10-Normalnatronlauge gelöst, mit Wasser verdünnt und unter Kochen 1,5 g Hydrosulfit in drei Portionen à 0,5 g eingetragen. Die rotviolette Farbe schlägt über Ziegelrot in ein reines Gelb um, die Lösung, die sauer reagiert, trübt sich unter Abscheidung eines kristallinischen Niederschlages. Von diesem wird filtriert und die hellgelbe klare Lösung auf dem Wasserbad eingedampft. Der orangefarbene Rückstand wurde zunächst mit absolutem Alkohol ausgezogen, wobei kaum etwas in Lösung geht. Ebenso wenig wird von Pyridin etwas aufgenommen. Nach Vertreiben des Pyridins auf dem Wasserbad wurde der Rückstand mit salzsaurem Methylalkohol behandelt, dieser filtriert und mit Wasser versetzt. Dabei entsteht eine mikrokristallinische Fällung. Auch aus dem salzsauren Methylalkohol wurde eine Kristallisation in langen, schmalen Nadeln erhalten. Die weitere Untersuchung der Reduktionsprodukte mußte abgebrochen werden.